

[0021]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2006年

<https://doi.org/10.15017/15429>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 21, 2007-05. Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



感染制御学分野

Division of Host Defense

当研究分野では病原微生物から宿主を防御する生体防御機構を解明し、その分子基盤に基づいて生体防御機構を再構築することによって、難治性疾患（感染症、癌、アレルギー、自己免疫疾患、移植拒絶）の先端的治療法の開発をめざしている。生体防御機構を食細胞による自然免疫、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞などの原始的リンパ球による早期誘導免疫、さらにリンパ球による適応免疫に分類し、以下のテーマで研究をすすめている。

- (1) 自然免疫：好中球，マクロファージ，Toll-like receptor (TLR) と感染防御
- (2) 早期誘導免疫： $\gamma\delta$ 型 T 細胞，NKT 細胞，粘膜系 T 細胞と感染防御
- (3) 適応免疫：感染後のメモリー CD8T 細胞の産生，維持の分子機構

人事面では平成 18 年(2006)7 月 1 日よりデジタルメディスン前田直良助手が共同研究者として参加した。平成 18 年 4 月 1 日から大学院医学系学府博士課程 1 年堀亜希子（整形外科），武内在雄（泌尿器科）が参加した。平成 18 年 7 月 1 日医科学修士課程 1 年中村梨沙，鷲東みのりが参加した。平成 19 年李偉（テクニカルスタッフ）が中国河北医科大学直属第三病院教授として帰国した。平成 19 年 3 月 31 日で上領頼之（泌尿器科），村上大輔（耳鼻科），土居岳彦（小児科），中里健二（群馬大学外科）が医学博士号を取得した。

A．自然免疫

Tyk2 ノックアウト(KO)マウスの骨髓細胞から誘導したミエロイド系樹状細胞は IL-10 の産生が高く，ペプチドをパルスして免疫しても Th 1 応答が低いことがわかった（Eur. J. Immunol. 36:3060-3070, 2006）。

納豆成分のレバンが腸管免疫を介して細胞免疫（TH 1）を増強することを見だし，機能性食品として商品開発につながると期待される（Clin. Exp. Allergy 36:96-101, 2006）。

B．早期誘導免疫

胆管結紮マウスでは結紮後早期に肝障害が認められる。この肝障害は NKT 細胞が特異的に欠損しているマウス(J α 281 KO マウス)では，ほとんど認められず，また TLR2 欠損マウス，FasL 変異 *gld/gld* マウスでは，肝障害は有意に減弱していた。ナイーブマウスの NKT 細胞を胆汁酸の成分で in vitro で刺激すると FasL の発現が誘導された。これらの結果から，胆管結紮による肝障害の系でも，TLR2 発現 NKT 細胞が重要な役割を担っていると考えられる(Gut 55:105-113, 2006)。

IL-15KO マウスでは腸管上皮間リンパ球のなかでとくに $\gamma\delta$ 型 T 細胞が減少していることを見いだした。IL-15KO マウス x Bcl-2 トランスジェニック(Tg)マウスを作製したところ，腸管上皮間 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球数は回復したが，転写因子 T-bet，Eomesdermin が低く，サイトカイン産生能および細胞傷害活性は回復しなかった。粘膜系 $\gamma\delta$ 型 T 細胞のホメオスタシス

スには IL-15 誘導 bcl-2 による抗アポトーシス作用のみならず，転写因子の誘導が関与していると考えられた (J. Immunol. 178:757-64.2007) .

C57BL/6 マウスに *Escherichia coli* (ATCC26) 1×10^8 CFU を腹腔内に感染させると，感染早期に腹腔内で IL-17 が産生され，好中球の浸潤を誘導した．IL-17 産生細胞をサイトカイン FACS で同定したところ，V γ 6/V δ 1TCR陽性T細胞であることがわかった．V δ 1KO マウスではIL-17の産生は認められなかった．今回の結果から，大腸菌感染による好中球浸潤に V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は IL-17 を産生することに貢献していると考えられた．(J. Immunol 178:4466-4472. 2007)

C . 適応免疫：メモリーT細胞の産生，維持の分子機構

IL-15-KO マウスでは感染 120 日目の肺での菌の排除が悪く，OVA 抗原特異的な CD8T 細胞の割合とその IFN- γ の産生，及び細胞傷害性が優位に低下していた．IL-15KO マウスにおいて感染後期あたる 120 日目では，抗原特異的な CD8T 細胞の維持が悪い．この機序として，細胞増殖が低下している事が要因ではなく，それらの細胞がアポトーシスにより消失している事が分かった．以上の結果から，肺におけるマイコバクテリア感染症の長期にわたる防御には IL-15 依存性 CD8T 細胞が重要であり，結核の内因性感染を防ぐためには CD8T 細胞による細胞生免疫を誘導することが必要であることが示唆された (J. Immunol. 176: 2496-2504, 2006) .

TB2 および MPT64 ペプチドパルス樹状細胞を免疫後，脾臓・肺・PEC における抗原特異的な MHC クラス Ia および Ib 拘束性 CD 8 陽性 T 細胞の変化を調べたところ，樹状細胞投与 6 日目に各臓器で抗原特異的な CD 8 陽性 T 細胞数がともにピークとなった．脾臓，肺では投与 60 日目には抗原特異的な CD 8 陽性 T 細胞が持続してみられたが，MHC クラス Ia 拘束性 CD 8 陽性 T 細胞が，MHC クラス Ib 拘束性 CD 8 陽性 T 細胞よりも多かった．一方，機能では MHC クラス Ia 拘束性 CD 8 陽性 T 細胞はサイトカイン産生能が高く，MHC クラス Ib 拘束性 CD 8 陽性 T 細胞はキラー活性が高いことがわかった．次にペプチドパルス樹状細胞の免疫から 6 日および 60 日後に BCG または *M. tuberculosis* を気道内および腹腔内感染させ脾臓・肺・腹腔内の生菌数測定し比較したところ，TB2 および MPT64 ペプチドパルス樹状細胞を免疫したマウスで各臓器で有意な菌数の減少が見られた．これらの結果より抗原特異的な MHC クラス Ia および Ib 拘束性 CD 8 陽性 T 細胞を誘導する DC ワクチンが結核症の予防に有効であることが明らかとなった．とくに多型性の少ない MHC クラス Ib 拘束性 CD 8 T 細胞を誘導する DC ワクチンは MHC クラス Ia の異なるおおくの宿主に利用できると期待される (J. Immunol. 176: 2496-2504, 2006) .

本研究ではエフェクター CD8T 細胞の AICD における IL-15 の役割について検討した．OT-I マウス (OVA257-264 特異的な TCR Tg マウス) から OT-I 細胞を単離しコントロールマウス，IL-15 トランスジェニック (Tg) マウスまたは IL-15 ノックアウト (KO) マウスに移入後，OVA 産生 *Listeria monocytogenes* を感染させ OT-I 細胞の動態をフローサイトメーターにて解析した．感染 7 日目のエフェクター OT-I 細胞の細胞数は三群間で顕著な差を認めないが AICD が起こる 10 日目ではコントロールマウスと比べ IL-15 Tg マウスで多く IL-15 KO マウスで著明に低

下していた。10 日目の OT-I 細胞をエフェクター細胞(CD127-CD62L-), エフェクターメモリー細胞(CD127+CD62L-), セントラルメモリー細胞(CD127+CD62L+)に分けて検討すると IL-15 Tg マウスではエフェクター細胞の分画が増加し IL-15 KO マウスではその分画が完全に消失していた。感染 7 から 10 日目にかけコントロールマウスでエフェクターOT-I 細胞の Bcl-2 発現上昇を認めるが IL-15 KO マウスでは認めず IL-15 Tg マウスではより上昇していた。感染 7-10 日目に IL-15 KO マウスに rIL-15 を連日投与するとエフェクターOT-I 細胞は Bcl-2 の発現上昇に伴い生存することができた。Bcl-2 を強制発現させた OT-I 細胞は IL-15KO マウスでも AICD を逃れ生存することができた。IL-15 による Bcl-2 発現上昇は, エフェクター CD8T 細胞の生存に必須であることが明らかとなった(*J. Immunol.* 176:507-15, 2006)。

業績目録

原著論文

1. Yajima T., Yoshihara K., Nakazato K., Kumabe S., Koyasu S., Sad S., Shen H., Kuwano H. and Yoshikai Y. 2006.
IL-15 regulates CD8⁺ T cell contraction during primary infection.
J. Immunol. 176: 507-515.
2. Xu Q., Yajima T., Li W., Saito K., Ohshima Y., and Yoshikai Y. 2006.
Levan (□-2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signaling: Induction of IL-12 production and suppression of Th2 response and IgE production.
Clin. Exp. Allergy 36: 96-101.
3. Ogawa A., Tagawa T., Nishimura H., Yajima T., Abe T., Arai T., Taniguchi M., Takeda K., Akira S., Nimura Y. And Yoshikai Y. 2006.
Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas dependent apoptosis in Peyer's patch and the liver at an early stage after bile duct ligation in mice.
Gut 55:105-113.
4. Yoshihara K., Yajima T., Kubo C. and Yoshikai Y. 2006.
Role of IL-15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice.
Gut 55: 334-341.
5. Khajoo V., Saito M., Takada H., Nomura A., Kusuha K., Yoshida S., Yoshikai Y. and Hara T. 2006.
Novel roles of osreopontin and CXC chemokine ligand 7 in the defence against mycobacterial infection.
Clin. Exp. Immunol. 143: 260-268.
6. Saito K., Yajima T., Kumabe S., Doi T., Sad S., Shen H. and Yoshikai Y. 2006.
Impaired protection against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection in IL-15 deficient mice.
J. Immunol. 176: 2496-2504.
7. Yu Q., Tang C., Xun C., Yajima T., Takeda K. and Yoshikai Y. 2006.
MyD88-dependent signaling for IL-15 production plays an important role in CD8αα TCRαβ and TCRγδ intestinal intraepithelial lymphocytes.
J. Immunol. 176: 6180-6185.

8. Nagata S., Okano S., Yonemitsu Y., Yoshida K., Nagata H., Nakagawa K., Tomita Y., Yoshikai Y., Shimada M., Maehara Y. and Sueishi K. 2006.
The critical roles of memory T cells and anti-donor immunoglobulin rejection of allogeneic bone marrow cells in sensitized recipient mice.
Transplantation 82:689-698.
9. Aoi N., Masuda T., Murakami D., Yajima T., Mizubuchi H., Yamada H., Kawauchi H. and Yoshikai Y. 2006.
Interleukin-15 prevents allergic rhinitis through reactivation of antigen-specific CD8⁺ T cells.
J. Allergy Clin. Immunol. 117: 1359-1366.
10. Aizu K., Li W., Yajima T., Arai T., Shimoda K., Nimura Y. and Yoshikai Y. 2006.
Regulatory roles of NKT cells in the induction and maintenance of cyclophosphamide-induced tolerance.
Eur. J. Immunol. 36:3060-3070.
11. Iwai T., Tomita Y., Shimizu I., Yasunami Y., Kajiwarra., Okano S., Yoshikai Y., Yaniguchi M., Nomoto K. and Yasui H. 2006.
An important role of Tyk2 in APC function of dendritic cells for priming CD8⁺ T cells producing IFN- γ .
J. Immunol. 177:8400-8409.
12. Hirose Y., Murosaki S., Yamamoto Y., Yoshikai Y. and Tsuru T. 2006.
Effect of Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 on Innate and Acquired Immunity in Healthy Adult Subjects: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.
J. Nutr 136:3069-3073.
13. Yoshikai Y. 2006.
Immunological protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection.
Crit Rev Immunol. 26:515-526.
14. Nakazato K., Yamada H., Yajima T., Kagimoto Y., Kuwano H. and Yoshikai Y. 2007.
Enforced expression of Bcl-2 restores numbers but not functions of TCR γ intestinal intraepithelial T lymphocytes in IL-15-deficient mice.
J. Immunol. 178:757-764.
15. Kajiwarra T., Tomita Y., Okano S., Iwai T., Yasunami Y., Yoshikai Y., Nomoto K and Yasui H. 2007.
Effects of cyclosporine A on the activation of NKT cells induced with α -galactoceramide.
Transplantation 83:184-192.
16. Murakami D., Yamada H., Yajima T., Masuda A., Komune S. and Yoshikai Y. 2007.
Lipopolysaccharide aggravates allergic airway inflammation via direct stimulation of mast cells.
Clin. Exp. Allergy 37:339-347.
17. Eto M., Harano M., Yatsugami K., Harada M., Kamiryo Y., Kiyoshima K., Hamaguchi M., Tsuneyoshi M., Yoshikai Y. and Naito S. 2007.
Cyclophosphamide-using nonmyeloablative allogeneic cell therapy against renal cancer with a reduced risk of graft-versus-host disease.
Clin. Cancer Res. 13:1029-1035.
18. Doi T., Yamada H., Yajima T., Wajjwalku W., Hara T. and Yoshikai Y. 2007.
Peptide-pulsed dendritic cells for MHC class Ib-restricted CD8⁺ T cells confer protection against *Mycobacterium*

tuberculosis.

J. Immunol. 178:3806-3813.

19. Shibata K., Yamada H., Hara H., Kishihara K., and Yoshikai Y. 2007.

Resident V-delta 1+ gamma-delta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production.

J. Immunol. 178:4466-4472.

20. Li W., Yamada H., Yajima T., Nakagawa R., Shimoda K., Nakayama K. and Yoshikai Y. 2007.

Tyk2 signaling is important for contraction of antigen-specific CD8+T Cells following a microbial infection.

J. Immunol. 178:4482-4488.

21. Sun X., Yamada H., Yoshihara K., Awaya A., and Yoshikai Y. 2007.

In vivo treatment with a nonapeptide thymic hormone, facteur thymique serique (FTS), ameliorates chronic colitis induced by dextran sulphate sodium in mice.

Int Immunophar 7:928-936.

総説

1. 鍵本香子, 吉開泰信. 2006
HSV に対する免疫応答
日本臨牀社 ヘルペスウイルス学, 890:178-183
2. 中里健二, 吉開泰信. 2006
NK 細胞の生存維持とサイトカイン
科学評論社 臨床免疫 Vol. 45 No. 5
3. 吉開泰信. 2007
感染防御機構における自然記憶リンパ球の役割
日本臨牀社 新感染症学, 上巻: 109-112

著書

1. 吉開泰信. 2006
T 細胞受容体の遺伝子 P. 34-35
食細胞の機能測定 P. 126-128
感染免疫応答の検出 P. 178-182
感染症: 新しいワクチンの作成 P. 306
免疫実験法ハンドブック (中島泉編)
名古屋大学出版会 名古屋
2. 吉開泰信. 2006
感染に対する免疫 P. 111-142
免疫の傷害: 免疫不全症 P. 143-156
シンプル免疫学 (改訂第 3 版) (中島泉, 高橋利忠, 吉開泰信共著)
南江堂 東京
3. 吉開泰信. 2007

戸田新細菌学

南山堂 東京

4. 山田久方, 吉開泰信 . 2007
免疫応答による正常組織の破壊 P.373-375
エッセンシャル免疫学 (笹月健彦監訳)
メディカル・サイエンス・インターナショナル 東京

学会発表

1. 上領頼之, 江藤正俊, 山田久方, 原野正彦, 矢島俊樹, 立神勝則, 濱口益光, 武内在雄, 内藤誠二, 吉開泰信 (2006,4/12-15)
マウスミニ移植モデルにおける膀胱腫瘍に対する移植片対腫瘍効果の検討.
第94回日本泌尿器科学会総会・学術集会, 福岡.
2. 山田久方, 貝原信孝, 前田健, 首藤敏秀, 中島康晴, 岡崎賢, 岩本幸英 (2006, 4/23-26)
関節リウマチで増加するCD57陽性CD4T細胞はIL-15に反応し, マクロファージのTNF- α 産生を誘導する.
第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎
3. 牧野晋哉, 山田久方, 首藤敏秀, 前田健, 中島康晴, 岡崎賢, 岩本幸英 (2006, 4/23-26)
若年性特発性関節炎の関節破壊に対するレミケードの効果
第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎
4. 田代康隆, 首藤敏秀, 前田健, 中島康晴, 山田久方, 岡崎賢, 岩本幸英 (2006, 4/23-26)
THA, TKA 治療歴のある患肢にMRSAによる壊死性筋膜炎を合併した関節リウマチの一例.
第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎
5. 貝原信孝, 山田久方, 首藤敏秀, 中島康晴, 岡崎賢, 前田健, 岩本幸英 (2006, 4/23-26)
関節リウマチの腱鞘炎と関節炎の比較検討.
第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎
6. 首藤敏秀, 前田健, 中島康晴, 山田久方, 岡崎賢, 貝原信孝, 岩本幸英 (2006, 4/23-26)
Yearly progression rate を用いた関節破壊の進行モニタリング.
第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎
7. 福土純一, 首藤敏秀, 神宮司誠也, 三浦裕正, 前田健, 中島康晴, 山田久方, 岡崎賢, 岩本幸英 (2006, 4/23-26)
診断に難渋したムチランス様の多関節破壊を呈する骨溶解症の一例.
第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎
8. 原田洋, 首藤敏秀, 前田健, 中島康晴, 山田久方, 岡崎賢, 山本俊策, 諸岡正明, 増田祥男, 岩本幸英 (2006, 4/23-26)
診断に難渋したムチランス様の多関節破壊を呈する骨溶解症の一例.
第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎
9. 山田久方, 貝原信孝, 岩本幸英, 吉開泰信 (2006.7/27-29)

CD57+CD28-CD4⁺T 細胞は IL-15 に反応し、関節リウマチで増加する.

第 17 回日本生体防御学会学術集会, 札幌

10. 柴田健輔, 山田久方, 中川竜介, 吉開泰信 (2006.7/27-29)

IL-17 産生 γ δ T 細胞による大腸菌腹腔内感染後の好中球浸潤.

第 17 回日本生体防御学会学術集会, 札幌

11. 隈部志野, 山田久方, 矢島俊樹, 中川竜介, 松口徹也, 吉開泰信 (2006.7/27-29)

Th1/Th2 細胞細分化における MKP-M(JNK 特異的 Dual specificity phosphatase)の役割.

第 17 回日本生体防御学会学術集会, 札幌

12. 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福士純一, 貝原信孝, 山田久方, 首藤敏秀, 堀内孝弘, 中島衡, 塚本浩, 前田健, 岩本幸英 (2006.9/9-10)

生物製剤使用中の RA 患者に対する整形外科手術の安全性の検討.

第 32 回九州リウマチ学会, 熊本

13. 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福士純一, 貝原信孝, 前田健, 山田久方, 堀内孝弘, 首藤敏秀, 岩本幸英 (2006.9/9-10)

RA に対する infliximab の臨床効果と副作用発現.

第 32 回九州リウマチ学会, 熊本

14. 上領頼之, 江藤正俊, 山田久方, 原野正彦, 矢島俊樹, 立神勝則, 濱口益光, 武内在雄, 内藤誠二, 吉開泰信 (2006.9/23-30)

マウスミニ移植モデルにおける膀胱腫瘍に対する移植片対腫瘍効果の検討.

第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜

15. 山田久方, 貝原信孝, 前田健, 首藤敏秀, 中島康晴, 岩本幸英 (2006.10/19-20)

関節リウマチで増加する CD57 陽性 CD4⁺T 細胞は IL-15 に反応し、マクロファージの TNF α 産生を誘導する.

第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会, 長崎

16. 貝原信孝, 山田久方, 首藤敏秀, 中島康晴, 岡崎賢, 岩本幸英 (2006.10/19-20)

関節リウマチの腱鞘膜炎の病理学的・分子生物学的検討.

第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会, 長崎

17. 山田久方, 吉開泰信 (2006.12/11-13)

IL-15 selectively expands CD57+CD28-CD4⁺T cells in active rheumatoid arthritis.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

18. 隈部志野, 山田久方, 矢島俊樹, 前田直良, 松口徹也, 吉開泰信 (2006.12/11-13)

A novel JNK specific dual-specificity phosphatase, DUSP16, negatively regulates Th2 responses.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

19. 柴田健輔, 山田久方, 吉開泰信 (2006.12/11-13)

critical role of γ δ T cells producing IL-17 in local influx of neutrophils after Escherichia coli infection.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

20. 土居岳彦, 山田久方, 原寿郎, 吉開泰信 (2006.12/11-13)

H2-M3-restricted CD8⁺T cells induced by peptide-pulsed dendritic cells confer protection against

Mycobacterium tuberculosis.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪.

21. 上領頼之, 江藤正俊, 山田久方, 原野正彦, 矢島俊樹, 立神勝則, 濱口益光, 武内在雄, 内藤誠二, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

IFN- γ produced by alloantigen-specific T cells plays a critical role in eradication of solid tumor by nonmyeloablative stem cell transplantation.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪.

22. 逸見百江, 山田久方, 前田直良, 隈部志野, 松口徹也, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

Roles of a novel dual specificity phosphatase, DUSP16, in the development and functions of CD8⁺ T cells.

第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪.

23. 石川天洋, 山田久方, 中川竜介, 前田直良, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

IL-15-dependnet CD8⁺T cells regulate reactivation of herpes simplex virus type 2 from latency in mice.

第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪.

24. 中里健二, 山田久方, 矢島俊樹, 桑野博行, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

Enforced expression of Bcl-2 restores numbers but not functions of TCR $\gamma\delta$ intestinal intraepithelial Tlymphocytes in IL-15 KO Mice.

第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

25. 村上大輔, 山田久方, 牟田浩美, 小宗静男, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

CD30/CD30 ligand mediated signaling is involved in Th2 cell respomses in a murine model of asthma.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

26. 孫遜, 山田久方, 吉原一文, 牟田浩美, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

Oxazolone-induced colitis is aggravated in CD30 Ligand-deficient mice.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

27. 唐策, 山田久方, 牟田浩美, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

Impaired Protection against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Infection in CD30L-Deficient Mice.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

28. 度会浩志, 関根悦子, 井上小夜, 中川竜介, 谷口克, 改正恒康, 山田久方, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

I 型インターフェロン産生に必至な活性化 PDC 特異的新規レセプターの同定と機能解析.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

29. 李偉, 山田久方, 下田和哉, 中山敬一, 吉開泰信 (2006,12/11-13)

Tyk2 signaling in important for contraction of Ag-specific CD8⁺T cells following *Listeria* but not *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Gue'rin infection..

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪

30. 福士純一, 中島康晴, 光安廣倫, 山田久方, 岡崎賢, 馬渡太郎, 貝原信孝, 前田健, 岩本幸英 (2007.3/10-11)

膠原病に伴う距骨下関節脱臼の2例

第33回九州リウマチ学会, 大分

31. 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福士純一, 貝原信孝, 山田久方, 堀亜希子, 前田健, 吉澤誠司, 首藤敏秀, 岩本幸英 (2007.3/10-11)

MTY および生物学的製剤による RA の荷重関節破壊抑制効果の検討

第33回九州リウマチ学会, 大分

32. 中島康晴, 岡崎賢, 馬渡太郎, 福士純一, 山田久方, 前田健, 山本卓明, 神宮司誠也, 岩本幸英 (2007.3/10-11)

臼蓋骨欠損に対する cementless socket を用いた再建術の成績

第33回九州リウマチ学会, 大分

ワクチン開発構造生物学分野

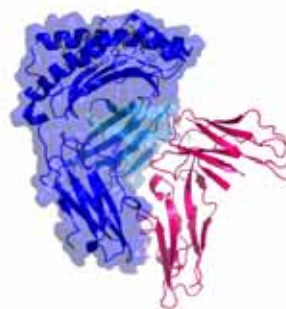
Division of Structural Biology

タンパク質の立体構造を決定し，他の分子との相互作用を詳細に解析することで，分子認識の問題や酵素活性メカニズムを構造生物学の手法を駆使することで明らかにしていく．ターゲット選択にあたっては，単に生物学的機能の重要性だけでなく，分子機能が構造生物学的に興味ある課題を含んでいるかどうかを重要視する．研究手法として，X線結晶解析と核磁気共鳴解析を組み合わせ用いることを特徴とする．将来的にはワクチンなどの創薬研究の構造的な基盤を提供する．九州大学共同利用施設として，結晶回折装置や核磁気共鳴装置のユーザー管理を行っており，九州大学における構造生物学の拠点形成を目指している．

A. 免疫系レセプター群

(LIR タンパク質ファミリー，MHC I タンパク質ファミリー)

免疫系細胞表面に広く発現するイムノグロブリン様ドメインをもつ膜タンパク質は，他の細胞表面にある MHC クラス I 分子やその他のタンパク質に結合して，免疫反応の増強や減弱などの調節を行っている．母体と胎児の接点である胎盤では免疫系の働きを抑える特殊な免疫寛容システムが存在する．胎盤の栄養膜細胞には HLA-G と呼ばれる細胞表面抗原が特異的に発現し，母体側の免疫細胞は HLA-G に対する抑制性レセプター (Leukocyte Ig-like receptor (LILR) ファミリーなど) を発現するため，胎盤では免疫寛容が誘導される．我々は LILR ファミリーのうち白血球に広く発現する抑制型レセプター



図A LILRB2 と HLA-G との複合体の立体構造

LILRB2 と HLA-G との複合体の X 線結晶構造解析に成功した．その結果，LILRB2 は HLA-G の重鎖 $\alpha 3$ ドメインの HLA-G に特徴的な疎水性領域を強く認識することがわかった．これにより，HLA-G が他の MHC クラス I 分子に比べ強く結合するようになると考えられる．また，MHC に対する認識様式が，LILRB2 と LILRB1 は異なり，LILRB2 はより $\alpha 3$ ドメインを認識していた．これは LILRB2 が軽鎖 $\beta 2$ ミクログロブリンに非依存的な認識をすることと合致する結果と考えられる．

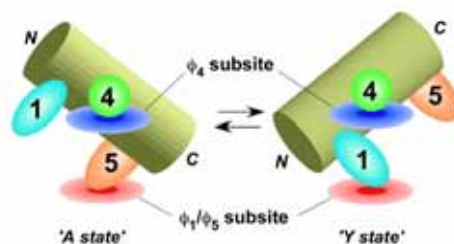
B. Tom20 タンパク質

ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は細胞質のリボソームで合成された後に，ミトコンドリアへと輸送される．ミトコンドリア・マトリクスへ輸送されるタンパク質は N 末端に余分な配列 (プレ配列) が付加された前駆体として合成される．昨年度までにプレ配列受容体である Tom20 サブユニットとプレ配列との複合体を分子間 S-S 結合を用いて安定化して結晶化し，構造を決定した．プレ配列のコンセンサス配列 $\phi_1\chi\chi\phi_4\phi_5$ (ϕ は疎水性残基) を Tom20 が少なく

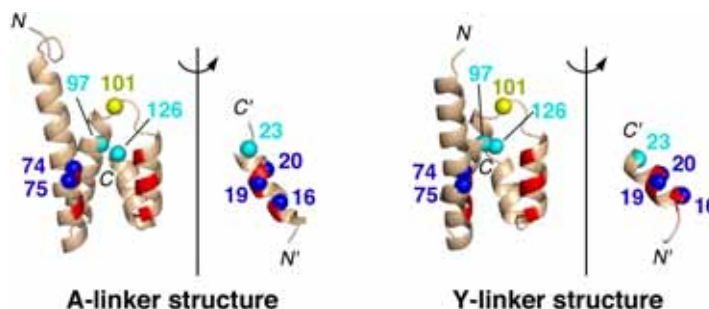
とも2つの異なる結合様式を使って、動的に認識しているという極めて斬新な分子認識機構を提案した(図B 1)。

これを証明するためにNMR ^{15}N 緩和時間解析を行った。Tom20のコア構造にプレ配列を分子間SS結合で固定した複合体を調製した。シグナルの重なりを最小限に抑えるために、プレ配列ペプチドのみに ^{15}N 標識したものと、Tom20にのみ ^{15}N 標識したものをそれぞれ調製し、 R_1 , R_2 , heteroNOEの測定を298Kで600MHz NMR装置を用いて行った。

モデルフリー解析から各残基の R_{ex} を推定した。また、transverse CSA/dipolar cross-correlation rate (η_{xy})測定からも R_{ex} を推定した。2つの方法による R_{ex} の値は良く一致した。 R_{ex} の大きい残基(1 s^{-1} 以上)をX線結晶構造解析による2つの立体構造にマッピングした(図B 2)。疎水性接触面に存在するTom20のI74, Q75及びペプチドのS16, L19, S20のアミド ^{15}N で大きな R_{ex} が観測された。これは分子間SS結合でTom20上に繋ぎ止められているプレ配列は、溶液中において結合状態においてもサブミリ秒の運動を行っていることを意味し、結晶構造解析により推定された動的認識モデルをサポートする。



図B 1 Tom20 分子がゆるい特異性を示すことを説明する分子認識モデル



図B 2 複合体を本のように矢印で表すように開いて、Tom20 とプレ配列ペプチドの間の接触面の様子を示している。

C. セレノシステイン特異的伸長因子 SelB

セレノシステイン Sec は「21 番目のアミノ酸」と呼ばれ、遺伝子上に特殊にコードされたアミノ酸である。通常終止コドンである UGA が引き続く特殊な2次構造をもつ RNA 配列 (SECIS) が存在するとき、UGA コドンが Sec の遺伝子コードに変身し、蛋白質中に取り込まれる。その際に Sec 特異的伸長因子 SelB が必要となる。SelB は通常の伸長因子 EF-Tu と異なり、Sec 特異的 tRNA を結合する EF-Tu に相同性の高い N 末端ドメインと、SECIS RNA を認識する特別な C 末端ドメインを持つ。これまでに我々は *M. thermoacetica* SelB の C 末端ドメイン (512-634) と SECIS mRNA ヘアピンとの複合体の結晶構造解析を行っていたが、これに加えて、C 末端ドメイン全長 (SelB-C, 377-634) と SECIS mRNA ヘアピンとの複合体の結晶構造解析に成功した。C 末端ドメイン全長は4つの winged helix (WH) 様構造を有している。これまでの SelB-SECIS RNA 相互作用以外に、予想外の RNA 結合様式が存在することがわかった。SelB-C の WH3 と WH2 のドメイン間の領域が RNA のリン酸骨格のみを認識し、塩基特異性はないと考えられたことから、tRNA や rRNA の認識に重要な役割を果たす可能性が考えられた。同時に SelB 全体の動的な構造変化とリボソームの間でのコミュニケーションを考察することができた。

業績目録

原著論文

1. Y. Miao, Y. Zhang, K. Nakagaki, T. Zhao, A. Zhao, Y. Meng, M. Nakagaki, E. Y. Park, K. Maenaka, 2006.
Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 71, 192-199.
2. M. Shiroishi, D. Kohda, K. Maenaka, 2006.
Preparation and Crystallization of the disulfide-linked HLA-G dimer.
Biochim. Biophys. Acta, 1764, 985-988.
3. M. Shiroishi, K. Kuroki, T. Ose, L. Rasubala, I. Shiratori, H. Arase, K. Tsumoto, I. Kumagai, D. Kohda, K. Maenaka, 2006.
Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer.
J. Biol. Chem., 281, 10439-10447.
4. I. Nobuhisa, R. Takeya, K. Ogura, N. Ueno, D. Kohda, F. Inagaki, H. Sumimoto, 2006.
Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47^{phox} in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22^{phox}.
Biochem. J., 396, 183-192.
5. M. Shiroishi, M. Kajikawa, K. Kuroki, T. Ose, D. Kohda, K. Maenaka, 2006.
Crystal structure of the human monocyte activating receptor, "Group2" leukocyte Ig-like receptor A5 (LILRA5/LIR9/ILT11).
J. Biol. Chem., 281, 19536-19544.
6. M. Shiroishi, K. Kuroki, L. Rasubala, K. Tsumoto, I. Kumagai, E. Kurimoto, K. Kato, D. Kohda, K. Maenaka, 2006.
Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d).
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 103, 16412-16417.
7. K. Kuroki, S. Kobayashi, M. Shiroishi, M. Kajikawa, N. Okamoto, D. Kohda, K. Maenaka, 2007.
Detection of weak ligand interactions of leukocyte Ig-like receptor B1 by fluorescence correlation spectroscopy.
J. Immunol. Methods, 320, 172-176.
8. H. Thananchai, G. Gillespie, M.P. Martin, A. Bashirova, N. Yawata, M. Yawata, P. Easterbrook, D.W. McVicar, K. Maenaka, P. Parham, M. Carrington, T. Dong, S. Rowland-Jones, 2007
Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B.
J. Immunol., 178, 33-37.
9. T. Ose, N. Soler, L. Rasubala, K. Kuroki, D. Kohda, D. Fourmy, S. Yoshizawa, K. Maenaka, 2007.
Structural basis for dynamical interdomain movement and RNA recognition of the selenocysteine specific elongation factor SelB.

Structure, in press

10. K. Sasaki, T. Ose, N. Okamoto, K. Maenaka, T. Tanaka, H. Masai, M. Saito, T. Shirai, D. Kohda, 2007.

Structural basis of the 3'-end recognition of a leading strand in stalled replication forks by PriA.

EMBO J., in press

総説

1. 白石充典, 黒木喜美子, 神田大輔, 前仲勝実, 2007

総説 エントロピー駆動型の受容体・リガンド相互作用: 免疫細胞表面受容体 LILR(ILT/LIR/CD85)群の分子認識

生物物理 47, 93-99.

学会発表

1. 梶川瑞穂 (2006, 2/22)

MHC クラス I 様分子 MILL の構造・機能解析

21 世紀 COE プログラム 第 4 回若手研究者統合発表会, 福岡

2. 白石充典, 黒木喜美子, 梶川瑞穂, 田畑栄一, 中村聖子, 福永裕子, 尾瀬農之, ラスバラ リンダ, 白鳥行大, 荒瀬尚, 神田大輔, 前仲勝実 (2006, 2/22)

ヒト胎盤特異的HLA-G抗原の二量体の持つ強い免疫抑制シグナル伝達とその立体構造基盤
第3回産学連携フォーラム in 東京, 東京

3. 神田大輔 (2006, 3/16)

停止したDNA複製フォークを探索-PriAタンパク質によるDNAの3'末端残基の分子認識-

九州シンクロトロン光センター生体分子構造研究会, 鳥栖

4. 佐々木香織, 尾瀬農之, 田中卓, 岡本直明, 前仲勝実, 正井久雄, 神田大輔 (2006, 3/17)

E. coli 由来PriAのN末端ドメインによるDNA 3'末端認識の構造的基盤

第4回産学連携フォーラム in 福岡, 福岡

5. 神田大輔 (2006, 4/24-4/26)

「ゆるい相互作用をX線結晶解析とNMRで見る」, ワークショップ3「複合した手法によるタンパク質構造解析」

第6回日本蛋白質科学会, 京都

6. 佐々木香織, 梶川瑞穂, 黒木喜美子, 本橋智子, 霜島司, 朴龍洙, 神田大輔, 前仲勝実 (2006, 4/24-4/26)

BmNPV バクミドシステムを用いたカイコ個体でのヒト免疫細胞表面レセプターKIRの大量発現

第6回日本蛋白質科学会, 京都

7. 田畑栄一, 黒木喜美子, 白鳥行大, 荒瀬尚, 神田大輔, 前仲勝実 (2006, 4/24-4/26)

ペア型レセプター Paired Ig-Like type2 Receptor(PILR)の構造解析

第6回日本蛋白質科学会, 京都

8. M. Igura, T. Obita, T. Ose, T. Endo, K. Maenaka, D. Kohda (2006, 6/18-6/23)

- Tom20 receptor recognizes the mitochondrial presequence through dynamic equilibrium.
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto
9. S. Nakamura, K. Kuroki, I. Ohki, K. Sasaki, T. Maruyama, M. Ito, M. Ikura, K. Yamamoto, N. Matsumoto, D. Kohda, K. Maenaka (2006, 6/18-6/23)
Molecular basis for recognition of E-cadherin by killer cell-lectin like receptor, KLRG1.
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto
 10. S. Tabata, K. Kuroki, L. Rasubala, I. Shiratori, H. Arase, D. Kohda, K. Maenaka (2006, 6/18-6/23)
Molecular Basis for Ligand Recognition of Paired Immunoglobulin (Ig)-Like Type2 Receptor (PILR).
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto
 11. K. Sasaki, T. Ose, T. Tanaka, N. Okamoto, K. Maenaka, T. Shirai, H. Masai, D. Kohda (2006, 6/18-6/23)
Structural basis for the recognition of the 3'-terminus of DNA by PriA protein.
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto
 12. K. Maenaka (2006,7/10)
Molecular basis for LILR recognition of HLA-G and its dimer. (Plenary session)
4th International Conference on HLA-G, Paris
 13. M. Kajikawa, K. Sasaki, K. Kuroki, T. Motohashi, T. Shimojima, E. Y. Park, D. Kohda, K. Maenaka (2006, 9/25-9/26)
Baculovirus expression system in silkworms using BmNPV bacmid DNAs
Cambridge Healthtech Institute's Conference baculovirus Technology, Massachusetts, USA
 14. D. Kohda (2006, 10/30-10/31)
Recognize not to discriminate: mechanism of nonselective base recognition of 3'-terminus of DNA by PriA protein.
The 2nd Sapporo Conference 2006; New Trend in Structural Biology, Sapporo
 15. T. Saitoh, M. Igura, R. Kojima, T. Obita, K. Maenaka, D. Kohda (2006, 10/30-10/31)
Dynamic recognition of mitochondrial presequences by Tom20.
The 2nd Sapporo Conference 2006; New Trend in Structural Biology, Sapporo
 16. M. Igura, N. Maita, J. Kamishikiryou, K. Maenaka, D. Kohda (2006, 11/13-11/16)
Crystallization of the catalytic subunit of archaeal oligosaccharyltransferase.
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa
 17. K. Kuroki, M. Shiroishi, Y. Fukunaga, D. Kohda, K. Maenaka (2006, 11/12-11/16)
Comprehensive analysis of the MHCI binding of leukocyte immunoglobulin-like receptors using surface plasmon resonance technique.
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa
 18. M. Kajikawa, K. Sasaki, K. Kuroki, T. Motohashi, T. Shimojima, EY. Park, D. Kohda, K. Maenaka (2006, 11/12-11/16)
BmNPV expression system; Application to human natural killer cell receptors.
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa

19. S. Nakamura, K. Kuroki, I. Ohki, K. Sasaki, T. Maruyama, M. Ito, M. Ikura, K. Yamamoto, N. Matsumoto, D. Kohda, K. Maenaka (2006, 11/12-11/16)
Molecular basis for recognition of E-cadherin by killer cell-lectin like receptor, KLRG1.
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa
20. 斉藤貴士, 井倉真由美, 小島理恵子, 帯田孝之, 前仲勝実, 神田大輔 (2006, 11/22-11/24)
ジスルフィド結合で拘束した Tom20- プレ配列複合体の動的振る舞い
第 45 回 NMR 討論会, 京都
21. K. Kuroki, M. Shiroishi, Y. Fukunaga, D. Kohda, K. Maenaka (2006, 12/11-12/13)
Molecular recognition of leukocyte immunoglobulin-like receptor family to classical and nonclassical MHCIs.
第 36 回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪
22. M. Kajikawa, T. Baba, U. Tomaru, K. Maenaka, A. Ishizu, M. Kasahara (2006, 12/11-12/13)
MHC Class I-like MILL Molecules Are β 2-microglobulin-associated, GPI-anchored Glycoproteins That Do Not Require TAP for Cell Surface Expression.
第 36 回日本免疫学会・学術集会, 大阪
23. 田畑栄一, 黒木喜美子, 白鳥行大, 荒瀬尚, 神田大輔, 前仲勝実 (2006, 12/11-12/13)
Molecular Basis for Ligand Recognition of Paired Ig-Like Type2 Receptor (PILR).
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪
24. M. Igura, N. Maita, J. Kamishikiryo, T. Obita, K. Maenaka, D. Kohda (2006, 12/15)
Crystal structure of the catalytic domain of the oligosaccharyltransferase from thermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*.
21 世紀 COE プログラム 第 5 回若手研究者統合発表会, 福岡
25. 神田大輔 (2007, 2/27)
PriA タンパク質による DNA 3' 末端の塩基非選択的認識機構の解明
タンパク 3000 総合シンポジウム「タンパク 3000 の成果と今後のタンパク研究展望」,
東京
26. 前仲勝実 (2007, 2/27)
免疫系細胞表面受容体群のリガンド認識機構の構造基盤
タンパク 3000 総合シンポジウム「タンパク 3000 の成果と今後のタンパク研究展望」,
東京
27. Daisuke Kohda (2007, 3/30-3/31)
Relaxation study reveals a dual-mode interaction mechanism for mitochondrial presequence recognition by Tom20.
International Workshop on Perspectives on stable isotope aided NMR methods for protein structural analysis, Osaka

微生物ゲノム情報学分野

Division of Bioinformatics

当分野では、分子進化的視点からシステムとしての生体の機能解析を行っている。主要な題材は、核酸の塩基配列、タンパク質のアミノ酸配列と立体構造であるが、それらとゲノムやポストゲノムの情報を組み合わせた新たな機能情報の抽出の方法の開発を目指している。また、個別のケースについての応用解析も行っており、それらのいくつかについては実験研究者との共同研究を進めている。

A. 生体内ネットワークの解析

a. 共進化情報を利用したタンパク質間相互作用の予測

相互作用するタンパク質では、一方のタンパク質に生じた変異が、相互作用に影響を及ぼす場合、相手方タンパク質において、それを相補する形での変異が生じることで、相互作用が維持される。このため、相互作用するタンパク質では、一方の進化が他方の進化に影響を及ぼし、共進化する。共進化がおきると、相互作用する2つのタンパク質の系統樹は、相互作用しないものよりも類似していることが期待される。逆に、系統樹の類似性を評価することで、相互作用するタンパク質を予測する方法がいくつかのグループで開発された。実際には系統樹そのものを評価するのではなく、系統樹構築に利用される距離行列の類似性を、相関係数で評価することで予測が行われる。この方法をミラーツリー(mirror tree)法とよばれる。

ミラーツリー法には、擬陽性が多いという問題点が指摘されている。我々は、その原因が、距離行列の中に含まれるソースの生物の系統関係が評価されてしまうためであると考えた。ミラーツリー法で複数のタンパク質の間での相互作用を評価する際、共通のソース生物のセットから各タンパク質についてオーソログ配列を収集し、それらのアラインメントから距離行列が計算される。そのため、どの距離行列にも、同じ生物のセットの系統関係の情報が含まれることになる。我々は、そのような情報を除いた残差の中に相互作用情報が含まれていると考え、射影演算子を利用して生物の系統関係の情報を距離行列から除去し、その残差の相関で相互作用を予測する方法を開発した (Sato et al. 2005)。今回、別の観点から系統関係の情報を距離行列から除去して、その残差の相関をとって相互作用を予測するための新しい方法を開発した。 N 個のタンパク質があり、そのどれとそれが相互作用するかを予測したいとしよう。まず、同じソース生物種から、それぞれのタンパク質のオーソログ配列を収集し、それらのアラインメントから距離行列を作成する。次に、距離行列をベクトルに変換する。順序に意味はないが、 N 個の距離行列の要素のベクトル中のアレンジが同じになるようにする必要がある。今、 N 個のタンパク質のうち、タンパク質 i と j が相互作用するかを検討する場合を考える。この時、次の重回帰を考える。

$$|i\rangle = \sum_{k \neq i, j}^N \alpha_k |k\rangle + \varepsilon_i$$

$$|j\rangle = \sum_{k \neq i, j}^N \beta_k |k\rangle + \varepsilon_j$$

ここでケット記号は添字で表されるタンパク質の距離行列をベクトルで表したものである。それぞれの重回帰で、相互作用の検討相手が説明ベクトルとして含まれていないことに注意しよう。もし、タンパク質 i と j が相互作用していれば、相互作用の情報は残差の部分に残ることが期待される。そこで、この残差について相関係数をとる。このような相関係数のことを偏相関係数とよぶ。偏相関係数は、実際には重回帰を行う事なしに、相関係数行列の逆行列をとることで求める事ができる。今回のこの手法は、本来は条件付き独立の概念に基づいて、擬相関を示すペアを排除し、直接相互作用するものを選択するという目的で開発したのだが、むしろソース生物種の系統関係の情報の除去の効果を示した。偏相関係数を用いたタンパク質間相互作用予測は、射影演算子を用いるものよりも特異性の向上が見られ、擬陽性の数を減少させるのにこの方法は有効であった。しかし、擬陰性が増加し、感受性は低下した。タンパク質の数が多いことによるオーバーフィッティングも見られるようなので、さらなる改良の余地があると思われる。

b. ComC と ComD に生じた正の選択を利用した相互作用部位の同定

Streptococcus 属の自然形質転換能制御の中心的な役割を果たすのがペプチドフェロモンとして働く ComC とその受容体タンパク質 ComD である。ComC は翻訳後に切断され、C 末が CSP として分泌される。ComD は CSP の受容体として働く N 末ドメインと、His キナーゼとして働く C 末ドメインよりなる。近縁な株間でも ComC や ComD のアミノ酸配列は多様であるが、ComD による ComC の認識は特異性が高いことが知られている。そこで、同株認識に関する正の選択圧が ComC や ComD の配列多様性の原因ではないかと考え、2 種類の方法で検証した。まず、comC 遺伝子、comD 遺伝子それぞれの、同義置換率(Ks)、非同義置換率(Ka)を計算し、その比($\omega=Ka/Ks$)をとった。CSP をコードする領域や comD の N 末領域では、配列が類似するものほど ω が 1 以上であったが、それ以外の領域は comC 遺伝子も comD 遺伝子でも ω は 1 より小さかった。次に Yang らによって開発された PAML で検証を行なった。帰無仮説 H_0 を、塩基配列アラインメントのどのコドン・サイトの ω も 1 以上にならないとし、対立仮説 H_1 は、 H_0 のサイトに加え、 ω が 1 以上となるコドン・サイトも含まれるとして、尤度比検定を行なったところ帰無仮説は棄却された。これらの解析から、ComC の CSP 部分、ComD の N 末領域に正の選択圧が作用していることが示唆された。PAML で塩基配列アラインメントの各コドン・サイトの ω を推定したところ、 ω が 1 以上と推定されたコドン・サイトは、CSP や ComD の CSP に結合すると思われる領域をコードする部分に集中していた。ComC では ComD との相互作用に関与している残基が 5 個実験的に同定されているが、その内 4 つは正の選択圧が作

用しているコドンに対応していた（左図）。これらの解析から、ComC と ComD の両方に相互作用に根ざす正の選択圧が働いていることが判明した。

B. バイオインフォマティクスの基盤ツールの開発

a. 大量配列のマルチプル・アラインメントのためのガイドツリー構築アルゴリズム開発

配列の量が多い場合、配列アライメントのためのガイドツリー構築に莫大な計算時間やメモリが必要となる。この問題を解決するため近似的ガイドツリーの構築のための新規アルゴリズム PartTree を開発した。PartTree は以下のように再帰的に構成されている。

今、再帰的な深さ i において、グループ j に属す配列の和を $N_{i,j}$ と表す。最初のサイクルでは、 $i = 1$ で、 j も 1 しかとりえず、 $N_{1,1} = N$ となる。ただし、 N は現在考慮している全配列の本数となる。

また、 $\sum_j N_{i,j} = N$ である。

STEP1: $N_{i,j}$ 中の最長の配列を選択する。

STEP2: 選択された最長配列と、残り $N_{i,j} - 1$ の配列の類似度を計算する。

STEP3: $N_{i,j}$ 配列から seed となる配列 n 本の配列を選択する。 N 本の配列は、最長配列、それに対して最も類似度の低い配列、ランダムに選択された $n - 2$ 個の配列を含んでいる。

STEP4: 選択された n 本の配列間の類似度を計算し、究めて類似しているペアがある場合は、短いものを seed から削除する。

STEP5: STEP4 の処理で n 本になった seed の配列について、UPGMA で系統樹を作成する。

$n > N_{i,j}$ の時は、それ以上の処理をやめ、親サイクルに戻る。

STEP6: n 本の配列と、残る $(N_{i,j} - n)$ 本の配列の類似度を計算し、 n 本のいずれかの配列に分類する。この時、深さ $(i + 1)$ のサイクルにおいてグループ j に属している配列の数を $N_{i+1,j}$ と表す。

STEP7: STEP5 で子サイクルから返される部分木をまとめてガイドツリーを構成する。

本手法は、近似的な UPGMA ツリーの構築法であるが、通常の方法よりも高速であり、またアラインメントの精度への影響も少ないことを確認した。このアルゴリズムは、加藤によって開発されている配列マルチプルアラインメントプログラム MAFFT に実装されている (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>)。

業績目録

原著論文

1. H. Ichihara, K. Kuma, H. Toh, 2006
Positive selection in the ComC-ComD system of streptococcal species.
J. Bacteriol. 188, 6429-6434.
2. K. Kojima, K. Kuma, H. Toh, H. Fujiwara, 2006
Identification of rDNA-specific non-LTR retrotransposons in Cnidaria.
Mol. Biol. Evol. 23, 1984-1993.
3. T. Sato, Y. Yamanishi, K. Horimoto, M. Kanehisa, H. Toh, 2006
Partial correlation coefficient between distance matrices as a new indicator of protein-protein interactions.
Bioinformatics 22, 2488-2492.
4. K. Katoh, H. Toh, 2007
ParTree: an algorithm to build an approximate tree from a large number of unaligned sequences.
Bioinformatics 23, 372-374.
5. D.M. Standley, H. Toh, H. Nakamura, 2007
ASH structural alignment package: Sensitivity and selectivity in domain classification.
BMC Bioinformatics in press.

総説

1. W. Nemoto, H. Toh, 2006
Membrane interactive α -helices in GPCRs as a novel drug target (review)
Curr. Protein Pept Sci. 7, 561-575.
2. 佐藤 哲也、山西 芳裕、金久 實、藤 博幸
タンパク質間相互作用の共進化情報にもとづく予測
生物物理 47, 4-11 (2007)

著書

1. 藤 博幸. 2006.
バイオインフォマティクスとは何だろう
In: はじめのバイオインフォマティクス (藤 博幸 編) pp. 2-5 講談社, 東京.

学会発表

1. 藤 博幸、佐藤 哲也、山西 芳裕、金久 實 (2006, 4/24-26)
系統関係を利用したタンパク質間相互作用予測
ワークショップ3「タンパク質相互作用のバイオインフォマティクス:

ネットワークから超分子複合体まで」(太田 元規、河野 秀俊)
第六回日本蛋白質科学会年会, 京都

2. Toh, H. (2006 6/3-4)
Prediction of interface for GPCR oligomerization
The first international conference on advanced medical engineering and informatics
Reconstruction and restoration of biological function from molecule to body
招待講演 (2006), Osaka
3. Ichihara, H., Kuma, K., Toh, H. (2006 6/18-23)
Evolutionary analysis of proteins relevant to quorum sensing.
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB
Congress, Kyoto
4. 藤 博幸 (2006 6/22-23)
進化情報を用いたタンパク質の機能解析
神戸大学 自然科学研究科 前期課程 化学専攻 専門科目 特別講義, 神戸.
5. 藤 博幸 (2006 8/28-31)
バイオインフォマティクス特論
関西学院大学大学院講義, 三田
6. Toh, H. (2006 9/16-18)
Prediction of protein-protein interaction by using co-evolutionary information
Japanese-Korean Joint Meeting for Mathematical Biology (第 16 回数理生物学会大会)
(Plenary session:招待講演) Fukuoka
7. Toh, H. (2006 10/17)
Prediction of protein-protein interaction by using co-evolutionary information
Japan-UK Symposium on Protein Informatics toward the Understanding of Molecular
Interactions: From Small Ligand to large Protein Complexes 招待講演 Tokyo
8. Ebina, T., Arai, T., Toh, H., Kuroda, Y. (2006 11/13-16)
Domain Linker Prediction Using a Support Vector Machine (SVM)
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Meeting of the Biophysical Society of
Japan, Okinawa
9. Stadley, D M., Toh, H., Nakamura, H (2006 11/13-16)
Real-time Structure Based Queries at the Protein Data Bank japan
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Meeting of the Biophysical Society of
Japan (2006), Okinawa
10. Oda, H., Toh, H., Katoh, K. (2006 11/13-16)
Quantitative Analysis of Conservation of Amino Acid Residues Critical for Protein-Protein
Interaction

Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006), Okinawa

11. Nemoto, W., Toh, H. (2006 11/13-16)
A Novel Statistical Prediction Method for Multiple Protein-Protein Interaction Interfaces
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006), Okinawa
12. Toh, H, Sato, T., Yamanishi, Y., and Kanehisa, M. (2006 11/13-16)
Prediction of Protein-protein Interaction with Co-evolutionary Information.
“Structural Bioinformatics: Molecular Structures as the basis of Understanding Protein Network systems” *Symposium* (招待講演)
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006), Okinawa
13. 大安 裕美、水谷 正治、斎野 廣道、戸本 浩央、坂田 完三、藤 博幸 (2006 12/6-8)
二糖配糖体特異的グリコシダーゼの基質特異性に関する研究：モデリングによる変異体実験
日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」名古屋
14. 市原寿子、隈 啓一、藤 博幸 (2006 12/6-8)
ストレプトコッカス属の自然形質転換を制御する CSP-ComD 系における正の選択圧
日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」名古屋
15. 藤 博幸 (2006 12/17)
タンパク質相互作用の情報解析 進化的情報の利用
特別講演
第3回ナノ・バイオ・インフォ化学シンポジウム, 東広島
16. Sato, T., Yamanishi, Y., Ichihara, H., Kuma, K., Kanehisa, M., Toh, H. (2006 12/18-20)
Relationship between Data Size and Accuracy of Prediction of Protein-Protein Interactions by Co-Evolutionary Information
Genome Informatics 2006 Yokohama
17. 藤 博幸 (2007 1/13-14)
タンパク質間相互作用予測のためのインフォマティクス－相互作用予測の新たな試みとしての適応進化解析－招待講演
統合脳 プロテオミクス研究講演会 岡崎
18. 藤 博幸 (2007 1/27)
タンパク質情報解析
大阪大学臨床医工学融合研究教育センタ・臨床医工学・情報学スキルアップ講座
バイオメディカルインフォマティクスコース バイオインフォマティクス, 大阪
19. 藤 博幸 (2007 3/22-23)

タンパク質間相互作用と適応進化 – ComC と ComD の相互作用を例として
国立遺伝学研究所研究会「タンパク質の構造からゲノム情報解析まで」三島

防御分子構築学分野

Division of Molecular Design

当部門では、超高感度質量分析システムと、ヒト完全長 cDNA を活用した、大規模タンパク質ネットワーク解析プロジェクトを展開している。我々は世界最小のダイレクトナノ LC システムを独自に開発し、取り扱いにくく、失いやすいタンパク質を高感度に検出することに成功した。さらに、このシステムを用い、本来不可能とされてきた非特異的な吸着のないサンプルの処理の条件検討を高速に検索することに成功し、事実上ノイズのないハイスループット且つ高精度なタンパク質ネットワーク解析を可能とした。この解析プラットフォームの feasibility study としてヒト完全長 cDNA 2,200 個を bait として用い、ヒトの細胞中の約 3,500 の相互作用を検出した。これらのうちの新規相互作用から、これまでのゲノムの情報のみからは予想できなかった新たな生命システムの発見と、幾つかの疾患関連遺伝子の機能解析に成功した。

A. 疾患関連遺伝子の機能解析

プロテアソームを構成するサブユニット全てにタグを融合し相互作用分子を検出したところ、既知の全てのプロテアソームコンポーネントの他に、ダウン症の原因遺伝子である DSCR2 と癌関連遺伝子である HCCA3 及び Ump1 という遺伝子を発見した。これらは全て機能は不明で、機能に関わる報告は全くなされていなかった。面白いことにこれらの因子は成熟型のプロテアソームのコンポーネントを bait として時には検出されず、コア構造である alpha と beta サブユニットを bait とした時のみに検出される。またこれらの因子を bait とするとやはり、成熟型のプロテアソームのコンポーネントは同定されなかった。そこでこれらが巨大なプロテアソームのアッセンブリーをアシストするシャペロン(Proteasome Assembly Chaperone: PAC)であると仮説をたて検証実験を行った。その結果、DSCR2 と HCCA3 はヘテロ二量体を形成し、それぞれ別の alpha サブユニットと結合しアッセンブリーの起点となり、alpha リングの形成を促進する。Ump1 は beta リングの形成を促進しかつ DSCR2/HCCA3 複合体に beta リングを会合させるのである。さらに Ump1 はホモ二量体を形成しリングをダブルとし 20S のプロテアソームを完成させるのである。プロテアソームのアッセンブリーはプロテアソーム研究の最後の謎と呼ばれていたものであり、それを我々それにかかわる分子とメカニズムを初めて明らかにしたのである。この研究は新たな生命システムを発見したのみならず、遺伝子と病気の関係をも説明した。よく知られていることであるがガン細胞は大量のプロテアソームを必要とする。従ってプロテアソームの新生を活発にするためこれらの因子もガン細胞に高発現しており、その結果 HCCA3 がガンマーカーとして報告されていても何の不思議もないのである。また DSCR2 に異常があることがダウン症に Critical であるというこの遺伝子に異常があれば、個体の細胞全てでプロテアソームの量が減り、個体発生から成長の過程であらゆる異常が起きても不思議ではないのである。事実これらの PAC を細胞内でノックダウンすると新生プロテアソーム量が激減し、ガン細胞においては致命的である。この事はプロテアソームインヒビターが

強い抗腫瘍活性をもち、抗がん剤として有効である事実をもよく説明する。しかし、プロテアソームインヒビターは正常細胞を含め全てのプロテアソーム機能を阻害するため強い毒性があり、事実特殊な白血病の治療以外には認可されていない。しかし、我々が発見した PAC の機能を弱めるなら、新生プロテアソーム量を減らすだけであるから、ここをターゲットとするなら毒性の少ない抗がん剤を発見可能である。

B. ケミカルバイオロジー

プロテアソームアッセンプリファクターの発見はほんの一例に過ぎないが、タンパク質間相互作用を包括的にネットワークとして俯瞰することが可能となれば、自ずと疾患の発症メカニズム、新規治療法の開発・ドラッグターゲットの発見やバリデーションへとつながっていくことは、ほぼ確信を持つことが出来た。そこで今年度より、このようなタンパク質ネットワーク解析より得られた情報を基に、生体の分子ネットワークを化合物で制御するための基盤研究開発プロジェクト¹がスタートさせた。プロジェクトに於いては、ネットワーク制御上重要と思われるタンパク質、またはタンパク質相互作用をターゲットとして統一的なスクリーニングを実施し、得られた活性化合物の評価を行うことを目標としている。生体システムの制御に重要と思える相互作用を指標に化合物をスクリーニング出来れば効率よくケミカルプローブを取得可能なのである。従来の化合物スクリーニングでは、酵素活性や細胞死など、所謂生物活性を指標にした個別のアッセイ系を構築しなければならず、知恵と技術を搾りだし優れたアッセイ系を構築するためにかかる労力と時間が、これまでの化合物スクリーニングのボトルネックであった。しかし、タンパク質相互作用を指標とするならば、個別のスクリーニング系を立ち上げることなく、共通のプラットフォームにてスクリーニングが可能であるため、ケミカルジェノミックスを大きく加速可能である。そこで本プロジェクトでは、このような目的に最も適した蛍光イメージング技術を駆使したタンパク質間相互作用検出技術に関する研究開発を一つの軸足とする。このような目的に蛍光イメージング法の優れている点は(1)分子を固相化することなく、全て溶媒中での分子間相互作用検出を基礎としているため、試験管レベルは勿論、細胞レベル、ひいては臓器レベル、個体レベルでの検出・解析系へと共通の原理でスクリーニングを展開可能である。(2)検出のための反応処理時間を必要としないリアルタイムモニターが基本であるため、ハイスループット化に適する。また反応試薬が不要のため安価である。(3)試験管・細胞レベルのアッセイでは 384 マルチプレートでのアッセイが容易に行えるため、この点からも化合物スクリーニングに適する。

既に蛍光イメージングによるタンパク質相互作用解析の有用性は周知のことであったが、化合物が持つ自家蛍光などの問題からこれまで広く用いられておらず、スクリーニングのためにハイスループット化はなされていない。しかし、日本独自の蛍光タンパク質の開発等からこれらの問題は基本的には克服されつつある。たとえば、自家蛍光の影響を避けるために、蛍光タンパク質の輝度を増大する、あるいは励起波長と蛍光波長とを極端に離す、などの数々の工夫がなされてきている。また、励起光源と検出装置の高速スイッチングを行う、また、蛍光寿命範囲を考慮して、自家蛍光や散乱などの影響を避ける等、光学的に行う手法もまた有効である。これらのハードを支え

るためのソフト開発などの研究開発を行ない、生体制御に有用な相互作用が発見されれば直ちに化合物スクリーニングがスタートできるような体勢をパイプラインとして確立するのがプロジェクトの狙いである。またそのための cDNA ソース・リソースは「ヒト完全長 cDNA プロジェクト」の成果として世界をリードしており²、日本の持ち味が発揮できるものと思われる。

それとともにゲノムツールをモデル細胞・動物を駆使した表現型スクリーニングも平行して行う。これまで製薬業界あるいはアカデミアで行ってきたような個別のスクリーニングではなく、幅広い疾患・ターゲット分子を共通のプラットフォームでスクリーニング出来る汎用性の高いシステムを構築する予定である。

ここで得られた化合物は、上市される治療薬とならなくても、タンパク質間の相互作用を制御・抑制する低分子化合物は生体を制御し、生物学を深化させるためのケミカルプローブとして有効に利用できることは想像に難くない。

¹ NEDO「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」

² NEDO「ヒト完全長 cDNA プロジェクト」

業績目録

原著論文

1. Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., Murata, S. 2006.
A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes.
The EMBO journal 25, 4524-36.
2. Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., Murata, S. 2006.
Cooperation of Multiple Chaperones Required for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes.
Molecular cell 24, 977-84.
3. Hyodo-Miura, J., Yamamoto, T.S., Hyodo, A.C., Iemura, S., Kusakabe, M., Nishida, E., Natsume, T., Ueno, N. 2006.
XGAP, an ArfGAP, is required for polarized localization of PAR proteins and cell polarity in *Xenopus* gastrulation.
Dev Cell 11, 69-79.
4. Kajino, T., Ren, H., Iemura, S., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D.L., Matsumoto, K., Ninomiya-Tsuji, J. 2006.
Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway.
The Journal of biological chemistry 281, 39891-6.
5. Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., Watanabe, Y. 2006.
Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin.

Nature 441, 46-52.

6. Polouliakh, N., Natsume, T., Harada, H., Fujibuchi, W., Horton, P. 2006.
Comparative genomic analysis of transcription regulation elements involved in human map kinase g-protein coupling pathway.
J Bioinform Comput Biol 4, 469-82.
7. Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T., Nishijima, M. 2006.
Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein.
J Biochem (Tokyo) 139, 921-30.
8. Terasawa, K., Yoshimatsu, K., Iemura, S., Natsume, T., Tanaka, K., Minami, Y. 2006.
Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases.
Mol Cell Biol 26, 3378-89.
9. Yamada, M., Ohnishi, J., Ohkawara, B., Iemura, S., Satoh, K., Hyodo-Miura, J., Kawachi, K., Natsume, T., Shibuya, H. 2006.
NARF, an Nemo-like Kinase (NLK)-associated Ring Finger Protein Regulates the Ubiquitylation and Degradation of T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF).
J Biol Chem 281, 20749-60.

総説

1. 夏目徹. 2006.
ユビキチン - プロテアソーム系とオートファジー
蛋白質核酸酵素, 51, 1183-1188.
2. 夏目徹. 2006.
蛋白質相互作用を極める.
蛋白質核酸酵素, 51, 1714-7.
3. 夏目徹. 2006.
タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析からの展開: ケミカルバイオロジー
From Systematic Analysis of Protein Interaction Networks to Chemicalbiology.
細胞工学, 25, 613-8.
4. 夏目徹. 2006.
完全長ヒト cDNA を用いた大規模タンパク質ネットワーク解析.
脳21, 34, 279-283.

学会発表

1. 夏目徹 (2007, 3/24)
ケミカルバイオロジープロジェクト: 大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開,
第3回メタボリズムのゲノムネットワーク研究会, 大磯.
2. 夏目徹 (2007, 2/9)

ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開，

九州大学 生体防御医学研究所セミナー，九州大学.

3. 夏目徹 (2007, 1/22)
Systemic Analysis of Protein Interaction Networks using Human Full-Length cDNA ,
7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association , Hawaii.
4. 夏目徹 (2007, 1/9)
タンパク質ネットワーク大規模解析，
H18 クリニカルバイオインフォマティックス専門講座，東京大学臨床講堂
5. 夏目徹 (2007, 12/21)
ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開，
第3回びわこバイオ国際セミナー，滋賀県長浜市.
6. 夏目徹 (2006, 11/20)
ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開，
第6回 ケモゲノミクス研究会，京都大学薬学部記念講堂.
7. 夏目徹 (2006, 11/16)
タンパク質ネットワーク，
お茶の水女子大学再教育講座，お茶の水女子大学.
8. 夏目徹 (2006, 11/13)
ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析から創薬へ，
ゲノム創薬フォーラム 第9回シンポジウム，日本薬学会長井記念館.
9. 夏目徹 (2006, 11/1)
「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」プロジェクトの概要，
JBIC2006 プロジェクト研究成果報告会，東京.
10. 夏目徹 (2006, 10/20)
大規模タンパク質ネットワーク解析，
新領域創成特別講義Ⅰ，東京大学新領域創成学科.
11. 夏目徹 (2006, 9/30)
ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開，
第65回 日本癌学会学術総会 シンポジウム，パシフィコ横浜.
12. 夏目徹 (2006, 9/27)
ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開，
第23回 Combinatorial Chemistry 研究会，タワーホール船堀.
13. 夏目徹 (2006, 9/26)
ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開，
日本学術振興会ゲノムテクノロジー第164委員会シンポジウム，東京.

14. 夏目徹 (2006, 7/29)
ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開，
第30回 阿蘇シンポジウム，阿蘇プリンスホテル.
15. 夏目徹 (2006, 5/19)
大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開
遺伝子・デリバリー研究会 第6回シンポジウム，九州大学医学部キャンパス百年講堂.
16. 夏目徹 (2006, 5/18)
日本におけるケミカルバイオロジー
第54回質量分析総合討論会，大阪
17. 夏目徹 (2006, 5/9)
大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開
第2回 JST-SENTAN シンポジウム - 質量分析技術、先端計測機器への展開 - ，東京大手町ビルジグ
18. 夏目徹 (2006, 4/24)
ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開，
第6回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム，京都国際会館.

防御システム再生学

Division of Regeneration Biology

A．幹細胞に関する研究

幹細胞の未分化性維持・自己複製機構を解明することを目標として、造血幹細胞の研究をおこなった。幹細胞は、幹細胞を産み出す（自己複製する）能力をもつという点において、増殖・分化する前駆細胞とは区別される。この幹細胞の自己複製機構、または、未分化性維持機構を明らかにすることは、幹細胞の本質に関わる課題である。幹細胞は幹細胞だけで自律的にその生存が維持されているのではなく、幹細胞を取り巻くニッチによって、未分化性が維持されていると考えられる。我々は、以下のことを明らかにした。

Tie2 受容体陽性の造血幹細胞は、静止期幹細胞であり、骨内表面上で骨芽細胞に接して存在する。一方、骨芽細胞から Tie2 受容体の結合因子であるアンジオポエチン (Ang-1) が産成され、幹細胞の接着を促し、幹細胞を静止期(G0 期)にとどめている。この発見を端緒として、現在、幹細胞と骨芽細胞の相互作用が、「幹細胞/ニッチシナプス」という言葉で、国際的に解析が進んでいる。

細胞がニッチにあるというのは、いかなる意味をもつのかを問い、細胞周期のチェックポイント遺伝子である Ataxia telangiectasia mutated (ATM) 欠損マウスにおける造血幹細胞の機能を検討した。その結果、このマウスでは、幹細胞の自己複製能の低下が見られた。造血幹細胞において、活性酸素レベルが上昇しており、これを還元剤投与によって低下させると、幹細胞の機能が正常に復した。さらに下流のシグナルには、p16^{INK4a}, Rb などの細胞周期制御因子が関与していることが明らかとなった。また、ATM 遺伝子欠損マウスの骨髄造血幹細胞は、静止期になく、自己複製能の回復に伴い、静止期幹細胞が出現することを見いだした。

静止期幹細胞と分裂する幹細胞を遺伝子発現の違いから、新たにシグナル分子 (N-cadherin, mpl など) を同定し、それらを、Tie2 のシグナルと比較することにより、幹細胞の静止期化に必要な細胞周期制御因子を解析している。一方、ROS シグナルによる N-cadherin 制御を検討し、低酸素性ニッチにある静止期幹細胞がいかにニッチへの定着、離脱を調節しているかを明らかにしている。

骨髄におけるニッチ細胞は、骨芽細胞、血管内皮細胞、さらには幹細胞以外の前駆細胞を含む造血細胞からなると考えられる。そこで造血の場となる骨髄形成の過程を骨芽細胞ならびに破骨細胞の分化を中心に解析した。軟骨膜から FACS を用いて ALCAM 陽性細胞を分離し、骨芽細胞・軟骨細胞・脂肪細胞が、分化することを明らかにした。また、造血幹細胞からの破骨細胞の分化過程を解析し、細胞融合に関わる分子の存在を遺伝子破壊マウスで示した。

組織幹細胞の特性を明らかにするため、生殖幹細胞、毛包幹細胞の研究を開始した。

まず、FACS と精巣細胞移植技術の組み合わせで、精巣生殖幹細胞の濃縮と性状解析を達成した。次に、精巣と血液の幹細胞分画に共通に発現する分子を複数同定し、その一つの JAM4 接着分子についてはノックアウトマウスを作製した。さらに、造血幹細胞維持の必須分子 ATM が精巣の未分化細胞維持に必要であることも明らかにした。また、これまで幹細胞評価系がなかった前立腺の幹細胞機能評価法を確立した。

B . 血管新生・骨形成に関する研究

「血管新生の分子基盤解明」の研究を展開し発生期の生理的血管新生及び病態形成における血管・リンパ管新生の分子基盤を解明してきた。また、骨代謝研究においては、骨髄形成に貢献する破骨細胞研究を中心に研究を進めた。

発生期血管系構築研究では EphrinB2、Evi-1 が血管発生に、Angiopoietin-1 がリンパ管生成に、また九大との共同研究でユビキチンプロテオソーム系が血管発生における動脈・静脈分化に重要であることなど明らかにした。Angiopoietin に類似するが Angiopoietin 受容体 Tie2 に結合しない 6 つの新規 Angiopoietin 様因子ファミリーを同定し、これらの因子の解析を進め、ゼブラフィッシュを用いた解析で我々が新規クローニングした Angptl1 と Angptl2 が協調してゼブラフィッシュの血管システム構築に機能していることを明らかにした。病態における血管新生の分子機構では Angptl4 が血管新生抑制、血管透過性抑制を介してがん増殖を抑制することを見出した。また AGF/Angptl6 が血管新生と皮膚表皮細胞増殖を介して創傷治癒を促進させることを明らかにした。

マウス胎生期において、血管内皮前駆細胞が動脈あるいは静脈の特異性を獲得し、動脈・静脈・毛細血管からなる高次血管を構築する過程に関して研究している。胚体内において最初に認められる高次血管である背側大動脈・体節間血管・主静脈が形成される過程を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に解析した。現在は、血管内皮前駆細胞を EGFP ラベルしたマウス胚を用いて、初期胚における血管形成をリアルタイム解析することに取り組んでいる。また、内皮細胞特異的 p53 結合因子 Aspp1 (Apoptosis stimulating protein of p53) がリンパ管のパターン形成および機能に重要であることを見出した。血管とリンパ管は構造的にも機能的にもお互いに密接な関連があり、それらの形態形成機構を細胞レベル・分子レベルで包括的に理解することを目的として実験を進めている。

発生期・腫瘍血管新生を含めた、生体内のあらゆる血管新生において、その最先端の血管内皮細胞 (tip cell) が組織 VEGF に応じ、細胞外マトリックス scaffold に沿って filopodia を伸展することで方向性が決定されるが、その tip cell 自身が適切に成熟化していくことで機能的なネットワーク構築が形成される。この成熟化の過程において、循環血中 LIF による血管内皮細胞の STAT3 活性化、Angptl2 / Integrin α_v を介した血管内皮細胞の scaffold への接着、M-CSF 依存性に出現する骨髄単球由来 perivascular cell による tip cell の被覆が重要な役割を果たすことを見出した。

破骨細胞は造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系に属する細胞であり、分化の最

終段階で細胞融合による多核化を起こすことが知られていたが、その分子機構については不明であった。破骨細胞や樹状細胞に特異的に発現される分子、dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)をクローニングし、ノックアウトマウスを作製したところ、破骨細胞の細胞融合が完全に抑制されていることを見出した。これは、破骨細胞の多核化の分子機構を解析する端緒となった。

髄核とそれを取り巻く線維輪とからなる椎間板は無血管性組織として知られている。椎間板の中でも髄核に特異的に発現される分子、CD24 や VEGF(Vascular endothelial growth factor) の発現と機能の解析を行った。

C . 代謝研究

アンジオポエチンファミリーの遺伝子をクローニングし、その機能解析を行った。オーファンリガンドである AGF/Angptl6 のノックアウトマウスは、インスリン抵抗性の肥満を、トランスジェニックマウスはやせを示した。Angptl3 にも、脂質代謝調節作用がみられ、一部のアンジオポエチンファミリーがエネルギー代謝調節、糖代謝調節にも重要な役割を果たしていることが、明らかとなった。これは、全く予想しない発見ではあったが、血管新生とエネルギー代謝の連関という新しい領域を切り開く成果となった。また現在、Angptl4 (肝臓、脂肪細胞から分泌される) が飢餓で発現が上昇すること、腸管から食餌由来の脂質代謝調節でエネルギー源としての脂質貯蔵システムで機能していること、Angptl2 (脂肪細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、がん細胞から分泌される) が肥満、動脈硬化、担がん状態でその発現が変化し、病巣部への血管新生、マクロファージの誘導、炎症性変化をなどの病態進展に伴う組織再構築 (リモデリング) に積極的に関わっていることを見出している。

業績目録

原著論文

1. Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T: Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. **Blood**, 107: 1207-13, 2006
2. Fujita N, Miyamoto T, Imai J, Hosogane N, Suzuki T, Yagi M, Morita K, Ninomiya K, Miyamoto K, Takaishi H, Matsumoto M, Morioka H, Yabe H, Chiba K, Watanabe S, Toyama Y, Suda T: CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus (NP) of intervertebral discs. **Biochem Biophys Res Comm**, 30: 1890-1896, 2006
3. Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, Nabeshima Y-i: The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. **Development**, 133: 1495-1505, 2006
4. Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T: Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. **Nature Med**, 12: 446-451, 2006
5. Hirashima M, Suda T: Differentiation of arterial and venous endothelial cells and vascular morphogenesis. **Endothelium**, 13: 137-145, 2006
6. Odaka C, Morisada T, Oike Y, Suda T: Distribution of lymphatic vessels in mouse thymus: immunofluorescence analysis. **Cell Tissue Res**, 325: 13-22, 2006
7. Sung HK, Morisada T, Cho CH, Oike Y, Lee J, Sung EK, Chung JH, Suda T, Koh GY: Intestinal and peri-tumoral lymphatic endothelial cells are resistant to radiation-induced apoptosis. **Biochem Biophys Res Comm**, 345: 545-551, 2006

8. Nagai N, Oike Y, Izumi K, Urano T, Kubota Y, Noda K, Ozawa Y, Inoue M, Tsubota K, Suda T, Ishida S: Angiotensin type 1 receptor-medial inflammation is required for choroidal neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in press, 2006
9. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Ishikawa H, Suda T: Matsuo K: Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Matsuo Cell Metabolism*, 4: 111-21, 2006
10. Takubo K, Hirao A, Ohmura M, Azuma M, Arai F, Nagamatsu G, Suda T: Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of Atm-null testis. *Biochem Biophys Res Commun*, 351:993-99, 2006
11. Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kim N, Kang JS, Miyamoto T, Suda T, Lee SK, Pignolo RJ, Koczon-Jaremkó B, Lorenzo J, Choi Y. v-ATPase V(0) subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med*, 12: 1403-9, 2006
12. Nagamatsu G, Ohmura M, Mizukami T, Hamaguchi I, Hirabayashi S, Yoshida S, Hata Y, Suda T, Ohbo K: A CTX family cell adhesion molecule, JAM4, is expressed in stem cell and progenitor cell populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages. *Mol Cell Biol*, 26: 8498-506, 2006
13. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, Xu J, Ito M, Arai F, Suda T, Ito M, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia*, 21: 136-42, 2007
14. Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, Ohmura M, Naka K, Azuma M, Miyamoto K, Hosokawa K, Ikeda Y, Mak TW, Suda T, Hirao A: Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes. *J Immunol*, 178: 103-10, 2007
15. Cho CH, Jun Koh Y, Han J, Sung HK, Jong Lee H, Morisada T, Schwendener RA, Brekken RA, Kang G, Oike Y, Choi TS, Suda T, Yoo OJ, Koh GY: Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res*, 2; 100: 47-57, 2007
16. Miyamoto K, Y. Araki K, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A: Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell*, 1 July, 2007, 1-12 [Epub ahead of print]
17. Yagi M, Ninomiya K, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Morita K, Hosogane N, Matsuo K, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T: Induction of DC-STAMP by Alternative Activation and Downstream Signaling Mechanisms. *J Bone Miner Res*, 2007 Apr 2; [Epub ahead of print]

学会発表（国際会議/招待講演）

1. Suda T: Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. 2006 Trilateral stem cell meeting –Japan, France, Pittsburgh–, Paris, Jan 11-13, 2006
2. Suda T: Tools for identifying stem cell / niche cell interactions in the mouse. AACR Workshop on Cancer Stem Cells, Lansdowne, Maryland, Feb 1-4, 2006
3. Arai F: Regulation of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. 1st International Conference on Osteoimmunology: Interaction of the Immune and Skeletal Systems, Crete, May 28-June 2, 2006
4. Suda T: Stem cell self renewal and the bone marrow niche. European Hematology Association 11th Congress, Amsterdam, Jun 15-18, 2006
5. Suda T: Quiescent stem cells in the niche. 4th ISSCR Annual Meeting, Toronto, Jun 29-Jul 1, 2006
6. 須田年生：骨芽細胞ニッチと造血幹細胞
第 24 回日本骨代謝学会＜特別講演＞
平成 18 年 7 月 5 日-8 日 東京
7. Suda T: Niche regulation of quiescent stem cells by ROS. ASCB 2006 Summer Meeting: Stem Cell Niches, Boston, Jul 15-18, 2006
8. Suda T: Niche regulation of stem cells by reactive oxygen species. 20th Anniversary Symposium of the Finnish Cancer Institute, Helsinki, Aug 31-Sep 1, 2006
9. Arai F: Maintenance of stem cells in the niche. International Symposium on Hematopoietic Stem Cells VI, Tübingen, Sep 14-16, 2006
10. 須田年生：造血幹細胞とニッチ
第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会＜教育講演＞
平成 18 年 10 月 7 日-9 日 福岡
11. Suda T: Niche for stem cells. 7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Hawaii, Jan 21-25, 2007
Suda T: Molecular interactions at the bone: stem cell interface. Keystone Symposia, Stem Cell

- Interactions with their Microenvironmental Niche(X1) 2007, Keystone, Mar 2-7, 2007
12. Suda T: Niche regulation of hematopoietic stem cells by ROS. Gordon Research Conferences on Oxidative Stress and Disease. Ventura, Mar 11-16, 2007